

Le contrôle des teneurs en dioxines dans les produits agro-alimentaires : cohérence entre la réglementation européenne et les performances des méthodes d'analyse de routine

The control of the dioxin contents in foodstuffs: are routine methods of analysis able to implement the European regulation?

Par Jean Reber⁽¹⁾

(communication présentée le 27 novembre 2003)

RÉSUMÉ

Après un rappel du cadre réglementaire qui s'impose aujourd'hui aux laboratoires d'analyse, la structure des dioxines, furanes et PCB de type dioxines est décrite, les informations nécessaires à la compréhension de l'expression des résultats sont fournies, suivies d'un résumé de la méthode d'analyse. Les points qui, dans la réglementation européenne, sont susceptibles de créer des difficultés aux laboratoires d'analyse sont développés, documentés à l'aide des résultats des essais du Laboratoire de Rouen. Il apparaît en conclusion que les laboratoires devront réaliser un gros travail de mise au point et un investissement en matériel important pour suivre les évolutions de la réglementation européenne.

Mots-clés : dioxines, furanes, denrées alimentaires, alimentation des animaux, prélèvements, méthodes d'analyse.

SUMMARY

This article reviews the current rules and regulations which apply to laboratories. It also gives the structure of dioxins, furans and dioxin-like PCB, along with a summary description of the method of analysis, and the information required to understand analysis results. The aspects of the European regulation which may be problematic for laboratories are described, using the results provided by the Rouen Laboratory as an example. The authors conclude by saying that a lot of work and investment will be required for the laboratories to comply with the new European regulation.

Key words: dioxins, furans, foodstuffs, animal food, food samples analysis methods.

(1) Laboratoire de Rouen-ETSA 49, rue Mustel – 76022 Rouen cedex 3.

• INTRODUCTION

Afin de contrôler puis réduire l'exposition de la population aux contaminations par les dioxines, furanes et PCB de type dioxine par voie alimentaire, l'Union Européenne s'est dotée en novembre 2001 d'une réglementation fixant les teneurs maximales des dioxines et furanes dans l'alimentation des animaux et les denrées alimentaires.

Étant donné qu'il n'existe, à ce jour, aucune méthode d'analyse officielle ou normalisée pour les dioxines, furanes et PCB de type dioxine, la Commission Européenne a publié deux directives fixant les conditions d'échantillonnage et les prescriptions à respecter par les laboratoires dans le cadre des analyses officielles.

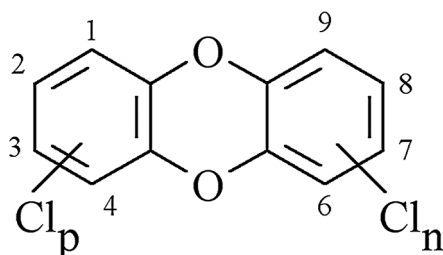
Deux questions seront posées par la Commission Européenne, la première en fin 2004 concernant l'inclusion des PCB de type dioxine dans les valeurs limites et la deuxième en fin 2006 concernant la réduction des valeurs limites et leur élargissement à d'autres denrées alimentaires.

Les valeurs limites de concentration en dioxines et furanes ayant été déterminées suivant l'avis du CSAH (Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine) qui a fixé une dose hebdomadaire tolérable (DHT) de 14 pg de OMS-TEQ/kg de poids corporel et les prescriptions de qualité ayant été établies sans référence aux moyens techniques à la disposition des laboratoires, la question peut se poser de la compatibilité des valeurs limites et des prescriptions avec les méthodes et matériel utilisés dans les laboratoires de contrôle.

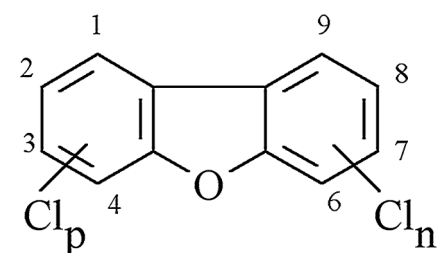
Nous présentons ci-dessous des éléments de réponse tirés de l'expérience du Laboratoire de Rouen-ETSA.

• DÉFINITIONS

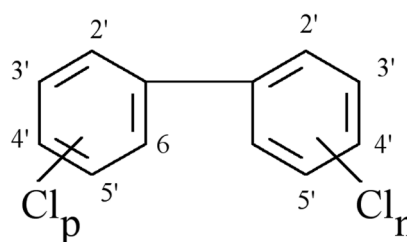
Structures des dioxines, furanes et PCB de type dioxine



Dioxines 75 congénères dont 7 substitués au moins en position 2,3,7,8



Furanes : 135 congénères dont 10 substitués au moins en position 2,3,7,8



PCBs : 209 congénères dont 12 sont de "type dioxine"

C'est la mesure des concentrations des 17 congénères « toxiques » substitués en 2,3,7,8 de dioxines et furanes qui est effectuée lors d'un dosage de « dioxines » dans un produit agroalimentaire.

TEF et TEQ

TEF (facteurs d'équivalence toxique) : facteurs de pondération permettant d'exprimer la toxicité d'un congénère relativement à celle du congénère le plus toxique, la 2,3,7,8-TCDD (dite « dioxine de Seveso »). La liste de facteurs d'équivalence toxique utilisée pour les analyses d'échantillons agroalimentaires a été définie en 1997 par l'OMS.

TEQ (quantité toxique équivalente), le résultat exprimé en pg/g ou en ng/kg à 12 % d'humidité selon l'équation suivante, n étant le nombre de congénères toxiques inclus dans le calcul :

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (\text{quantité mesurée} \times TEF_i)$$

Estimations basse, moyenne et haute

Le résultat final d'une analyse de dioxine/furane étant la somme des équivalents toxiques de 17 congénères dont certains peuvent ne pas avoir été détectés ou quantifiés et pour éviter des interprétations fausses ou tendancieuses, ce résultat doit être exprimé désormais de trois façons :

- « estimation basse » : on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à zéro.
- « estimation intermédiaire » : on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à la moitié de la limite de détection/quantification.
- « estimation haute » : on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à la limite de détection/quantification.

L'estimation haute du TEQ doit être inférieure à la limite réglementaire pour l'échantillon analysé.

Les textes européens publiés jusqu'à la fin de 2002 définissant les teneurs maximales font référence aux seuils de détection pour calculer les estimations hautes alors que les textes plus récents et les directives qui précisent les exigences de qualité font référence aux seuils de quantification, ce qui n'est pas sans importance compte tenu de la manière dont sont définis et calculés habituellement ces seuils.

Seuils de détection ou de quantification ?

Définitions classiques de ces seuils :

- il existe plusieurs méthodes, fournissant des résultats différents, pour calculer ces seuils ; on peut utiliser par exemple, le rapport signal/bruit d'un enregistrement qui doit être, calculé dans des conditions définies, d'au moins 3:1 pour le signal correspondant au seuil de détection et de 10:1 pour le signal correspondant au seuil de quantification ; quelle que soit la méthode de calcul utilisée, il existe un rapport de 10:3 entre le seuil de quantification et le seuil de détection.
- calculer une « estimation haute » en utilisant des seuils de quantification impose, pour une valeur limite réglementaire donnée, d'utiliser une méthode d'analyse trois fois plus sensible que si l'on utilise les seuils de détection.

Définitions à utiliser dans le cas des analyses de dioxines :

Les experts réunis dans un groupe de travail « analytique aspects-dioxins et PCB » semblent favorables à assimiler seuils de détection et de quantification.

Justesse et fidélité

- Justesse : degré de concordance entre le résultat de la mesure et la valeur réelle ou attribuée de la grandeur à mesurer.
- Fidélité : généralement calculée sous forme d'écart type, elle englobe la répétabilité et la reproductibilité et indique le degré de concordance entre les résultats obtenus par application répétée du procédé expérimental dans des conditions déterminées.

Référentiel

- Les directives européennes ne fournissent ni la méthode, ni la référence d'une méthode décrivant la manière de calculer les seuils de détection/quantification, les justesse et fidélité dans le cas très particulier des analyses de dioxine et le choix de la méthode utilisée est donc laissé à l'appréciation de l'analyste ou d'un auditeur.
- Il semble que les experts aient pris conscience des ambiguïtés et des lacunes des directives européennes et étudient les corrections à leur apporter, particulièrement en ce qui concerne les incertitudes de mesure et la méthode à utiliser pour décider de la conformité d'un produit en fonction du résultat d'analyse et de l'incertitude associée.

• MÉTHODE DE MESURE

Principe

Après extraction de la matière grasse et des « dioxines » par des modes opératoires adaptés à la nature

des échantillons, la mesure des PDDD/PCDF extraits est effectuée par un couplage de la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution avec un spectromètre de masse à haute résolution (CGHR/SMHR) par une méthode dite de « dilution isotopique ».

Référentiel

Les extractions sont effectuées par :

- l'un des modes opératoires de la norme NF EN 1528-2 (1997) ou par un mélange de solvants sous pression à chaud pour les échantillons secs ou pouvant être séchés puis broyés (méthode interne au laboratoire).

Les purifications des extraits, identifications et quantifications sont effectuées selon :

- EPA 1613 : méthode américaine citée dans les directives européennes

ou :

- NF EN 1948-2 et 1948-3 : les critères de qualité de ces méthodes, mises au point en Europe pour les mesures de PCDD/PCDF dans les rejets à l'émission sont facilement transposables aux échantillons agroalimentaires, ce sont ces exigences qui sont utilisées au Laboratoire de Rouen.

Résumé de la méthode

Préparation éventuelle des échantillons (séchage, broyage...).

Extraction de la matière grasse et/ou des dioxines suivant :

- 1^{re} option – une partie aliquote de l'échantillon est dopée par 16 étalons internes de PCDD/PCDF marqués au carbone 13, extraite, la totalité de l'extrait étant utilisée pour la suite du mode opératoire ;
- 2^e option – l'échantillon est extrait et une partie aliquote de l'extrait est dopée par 16 étalons internes de PCDD/PCDF marqués au carbone 13 et utilisée pour la suite du mode opératoire, cette option étant utilisée surtout pour les échantillons ne se prêtant pas à l'extraction sous pression à chaud et qui sont en général des produits gras (> 10 % MG).

Purification et concentration, ajout de deux étalons internes marqués au carbone 13 (utilisés pour quantifier les 16 étalons internes ajoutés précédemment).

Injection dans un couplage de la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution utilisant des colonnes capillaires de 30 à 60 m, à un spectre de masse haute résolution (R>10 000).

Calculs des taux de recouvrement des 16 étalons internes, identification et quantification des PCDD/PCDF présents dans l'échantillon en utilisant ces étalons internes (méthode dite de dilution isotopique), calcul du TEQ total.

• CONVERGENCE DES VALEURS LIMITES ET DES PRESCRIPTIONS DES DIRECTIVES EUROPÉENNES AVEC LA PRATIQUE ET LES MOYENS TECHNIQUES DES LABORATOIRES

Les directives européennes prescrivent que les laboratoires pratiquant les contrôles officiels des teneurs en PCDD/PCDF dans les produits agroalimentaires soient accrédités par un organisme tel que le COFRAC selon la norme EN ISO/CEI 17025 (2000) et précisent certaines exigences concernant les essais à blanc, les analyses d'échantillons de contrôle et la participation à des essais interlaboratoires, exigences que les laboratoires accrédités ou préparant leur accréditation satisfont obligatoirement.

L'impact de certaines prescriptions particulières sur la pratique des laboratoires d'analyse est décrit ci-dessous, à partir de l'expérience du Laboratoire de Rouen.

Valeurs limites et exigences de sensibilité

Compte tenu du mode de calcul de l'estimation haute du TEQ (voir 2.2 et 2.3), pour éviter à la fois le risque de

faux positifs et faux négatifs mais également pour permettre le suivi de l'évolution de la contamination des aliments en PCDD/PCDF (et PCB de type dioxine), la Commission Européenne a imposé que la limite de détection/quantification soit le 1/5^e de la limite réglementaire pour l'échantillon considéré.

On trouvera dans le **tableau** ci-dessous des produits pour l'alimentation animale et denrées alimentaires, pour lesquels le respect de cette exigence de sensibilité impose des conditions d'analyse et de réglage du matériel très fines et rigoureuses.

Les prises d'essai ont été déterminées à partir des estimations hautes des TEQ calculées comme il était indiqué au début de 2003 dans les règlements et directives fixant les teneurs maximales, les seuils de détection, calculés pour un enregistrement présentant un rapport signal/bruit de 3, étant ceux obtenus au laboratoire de Rouen en utilisant les modes opératoires de préparation de routine et les injections faites sur un couplage CGHR/SMHR MAT 95 XL.

Matière première ou produit	Teneur maximale pour les PCDD/PCDF	Prise d'essai pour vérifier 1/5 de la teneur maximale
Toutes les matières premières pour aliments d'origine végétales, y compris les huiles végétales et les produits dérivés	0,75 ng OMS TEQ/kg à 12 % d'humidité	11 g à 12 % d'humidité
Viandes et produits à base de viandes provenant de porcs	1 pg/g MG	9 g MG
Graisses animales de porcs	1 pg/g MG	9 g MG
Huiles végétales	0,75 pg/g MG	11 g MG

Sur la base des valeurs limites et des méthodes de calcul des TEQ valides au début de 2003, des aménagements des méthodes de purification et des conditions de réglage optimum du couplage CPGHR/SMHR permettent au Laboratoire de Rouen de respecter les exigences de sensibilité des directives européennes.

Si la Commission Européenne décide fin 2006 d'abaisser les valeurs limites de concentrations en PCDD/PCDF, les laboratoires devront améliorer leurs méthodes de purification et de suivi des blancs de procédure et utiliser un appareillage dont les performances devront atteindre le plus haut niveau.

Justesse et fidélité des méthodes de confirmation par CPGHR/SMHR

Les directives européennes imposent une justesse de $\pm 20\%$ et un coefficient de variation inférieur à 15 % pour la valeur totale en TEQ dans une certaine plage de concentrations autour de la valeur limite réglementaire.

Les résultats obtenus par le Laboratoire de Rouen lors des essais de validation, de sa méthode d'analyse des PCDD/PCDF dans les échantillons gras sont les suivants :

- la justesse moyenne, par congénère, est meilleure que $\pm 20\%$;

- la justesse du TEQ total, pour le point bas de la série d'essais, correspondant à une concentration de 5 pg/g MG, est légèrement meilleure que $\pm 20\%$;
- le coefficient de variation de la valeur totale du TEQ, pour ce même point bas, est inférieur à 15 %.

Ces résultats méritent quelques commentaires :

- la validation a été effectuée à partir d'échantillons synthétiques de matière grasse dopée ;
- le coefficient de variation du TEQ a été calculé en supposant qu'il provenait uniquement de variations aléatoires des concentrations des congénères.

Il est possible que pour des échantillons complexes et à des niveaux de concentrations correspondant aux exigences des directives, les tolérances concernant la justesse et le coefficient de variation des analyses soient difficiles à respecter.

Taux de récupération des étalons internes

La norme NF EN 1948-3 impose que le taux de récupération des marqueurs avant extraction des congénères de dibenzodioxines et dibenzofuranes tétra à hexachlorés soit compris entre 50 à 130 %, dans le cas général.

Dans les analyses de produits agroalimentaires le laboratoire applique cette exigence aux 16 étalons internes ajoutés avant extraction des PCCDD/PCDF ou sur l'extrait de matière grasse et il est exceptionnel que le taux de récupération des étalons internes soit en dehors des tolérances. Ceci nécessite alors de refaire l'analyse.

Les directives fixent que les taux de récupération des étalons internes doivent être compris entre 60 et 120 % pour les congénères de dibenzodioxines et dibenzofuranes tétra à hexachlorés, ce qui sera encore plus contraignant pour les laboratoires d'analyse.

Influence des congénères de PCDD/PCDF non toxiques

Les directives européennes sont silencieuses sur l'influence éventuelle de congénères de PCDD/PCDF non toxiques présentant, suivant les conditions de séparation par chromatographie en phase gazeuse, des temps de rétention et des spectres de masse identiques à ceux de congénères toxiques sont donc quantifiés comme tels, augmentant de ce fait la valeur totale du TEQ et étant donc une interférence potentielle de l'analyse.

S'il est vrai que ces congénères non toxiques sont généralement absents des denrées alimentaires car métabolisés, ils peuvent être présents dans des compléments alimentaires

contaminés par des « dioxines » à la suite de fraudes, contaminations naturelles ou procédés de fabrication mal maîtrisés.

Ces interférences potentielles peuvent être réduites, sinon supprimées par injection des extraits sur deux colonnes de chromatographie en phase gazeuse de polarités différentes.

• CONCLUSION

Le contrôle des teneurs maximales en PCDD/PCDF des aliments pour animaux et denrées alimentaires fixées par les règlements et directives européennes peut être effectué par un laboratoire d'analyse maîtrisant les modes de préparations et de purifications courantes des échantillons agroalimentaires, possédant un couplage CPGHR/SMHR maintenu au plus haut niveau de performance et un personnel compétent.

Les difficultés sont créées par les critères de performances prescrits dans les récentes directives, qui sont aux limites des possibilités actuelles des méthodes d'analyse.

Il est certain que, pour pouvoir respecter les prescriptions des directives et compte tenu de l'abaissement probable en 2006 des teneurs maximales admises, les laboratoires d'analyses qui veulent continuer à pratiquer des analyses de « dioxines » dans les produits agroalimentaires devront mettre rapidement au point des méthodes de préparation permettant de traiter de plus grandes prises d'essai de matière grasse et posséder un couplage CPGHR/SMHR très performant.

BIBLIOGRAPHIE

- Norme NF EN 1528-2 (1997) – Dosage des pesticides et des polychlorobiphényles – partie 2 – extraction de la matière grasse, des pesticides et des PCB, et détermination de la teneur en matière grasse.

- EPA Method 1613 (rev b 1994) Tetra-Through Octa-chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS.

- NF EN 1948-2 (1997) – Détermination de la concentration massique en PCDD/PCDF – Partie 2 : Extraction et purification.

- NF EN 1948-3 (1997) – Détermination de la concentration massique en PCDD/PCDF – Partie 3 : Identification et quantification.

- NF EN ISO/CEI 17025 (2000) – Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

- Règlement (CE) N° 2375/2001 du Conseil du 29 novembre 2001 – modifiant le règlement (CE) n°466/2001 de la commission portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.

- Directive 2001/102/CE du Conseil du 27 novembre 2001 – modifiant la directive 1999/29/CE concernant les substances et produits indésirables dans l'alimentation des animaux (texte repris dans l'arrêté du 14/08/2002, J.O.R.F. du 24/08/02).

- Directive 2002/69/CE de la Commission du 26 juillet 2002 – portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des dioxines et le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires.

- Directive 2002/70/CE de la Commission du 26 juillet 2002 – établissant des prescriptions pour la détermination des teneurs en dioxine et en PCB de type dioxine des aliments des animaux.

- Directive 2003/57/CE de la commission du 17 juin 2003 – modifiant la directive 2002/32/CE du parlement européen et du conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux.